

# NovoStart® SYBR High-Sensitivity qPCR SuperMix

目录号: E099

## 01/ 产品描述

本制品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。预混液中已经将 DNA 聚合酶、精心优化的反应 Buffer、dNTPs、SYBR Green I 等试剂预混在一起，是一种 2×浓度的预混型试剂，进行实验时，PCR 反应液的配制十分简单方便。

本制品使用新型抗体修饰的 HotStart Taq DNA 聚合酶，并结合精心优化的反应 Buffer，具有更高的扩增灵敏度，反应特异性和扩增效率，能够在更广泛的范围内进行准确定量。

## 02/ 产品用途

- 1) 高灵敏度: Novoprotein 精心配制的 RealTime PCR 专用 2×SuperMix，具有更高的扩增灵敏度和扩增效率。
- 2) 高特异性: 采用新型工艺制备抗体修饰的 HotStart Taq DNA 聚合酶，无需热启动即可进行 PCR 反应，大大提高 PCR 扩增的特异性。
- 3) 快捷: PCR 反应所必需试剂集于一管之中，数分钟即可完成反应体系配制。

## 03/ 质量控制

所有组分经检测均无核酸内切酶残留、核酸外切酶残留、核酸残留。

## 04/ 使用建议

- 1) 使用: 请上下颠倒混合均匀，避免起泡，并经过轻微离心后使用。反应液的配制、分装请使用新的（无污染的）枪头、Microtube 等，避免污染。建议反应体积为 20~50μl。
- 2) 引物设计: 一般为了增加灵敏度及扩增效率且抑制非特异性反应，扩增目标序列越短越好。建议扩增长度在 200bp 以下。

## 05/ 保存温度

-20℃避光储存，避免反复多次冻融。

## 06/ 产品包装

| 产品组成                                             | E099-01A | E099-01B |
|--------------------------------------------------|----------|----------|
| 2×NovoStart® SYBR High-Sensitivity qPCR SuperMix | 1ml×5    | 1ml×25   |
| RNase Free Water                                 | 1ml×5    | 1ml×23   |
| ROX Reference Dye I (ROX I)                      | 200μl    | 1ml      |
| ROX Reference Dye II (ROX II)                    | 200μl    | 1ml      |

### 用ROX I校准的Real Time PCR仪有:

ABI: 5700/7000/7300/7700/7900/7900 HT/7900 HT Fast/StepOne/StepOnePlus及其他仪器。

### 用ROX II校准的Real Time PCR仪有:

ABI: 7500/7500 Fast/ViiA7/QuantStudio 3,5,6 Flex,7 Flex12k Flex; Stratagene:MX4000/MX3500P/MX3000P及其他仪器。

## 不需要用ROX校准的Real Time PCR仪有：

Bio-Rad: CFX96/CFX 384/iCycler iQ/ iQ5/MyiQ/MiniOpticon/Opticon/Opticon2/Chromo4;

Eppendorf: MasterCycler ep realplex/realplex 2s;

Cepheid: SmartCycler;

Illumina: Eco qPCR;

Roche Applied Science: LightCycler480/LightCycler2.0/Lightcycler96;

Thermo Scientific: PikoReal Cycler;

Qiagen: Corbett Rotor-Gene Q/Rotor-Gene 3000/ Rotor-Gene 6000及其他仪器。

## 07/ 操作说明

### 1) 常用反应体系（20μl）：

| 试剂名称                                    | 反应加量           |
|-----------------------------------------|----------------|
| 2×NovoStart® SYBR High-Sensitivity qPCR | 10μl           |
| 上游引物                                    | 0.2-1.0μM（终浓度） |
| 下游引物                                    | 0.2-1.0μM（终浓度） |
| 模板                                      | 1-2μl          |
| ROX（需根据机器型号选择）                          | 0.4μl          |
| RNase Free Water                        | 至 20μl         |

### 2) 反应程序：

#### 两步法：

| 反应阶段  | 循环数                | 温度     | 时间     |
|-------|--------------------|--------|--------|
| 预变性   | 1                  | 95°C   | 30s*   |
| 变性    | 35-45              | 95°C   | 5s     |
| 退火/延伸 |                    | 60°C** | 30s*** |
| 溶解曲线  | 使用仪器默认溶解曲线采集程序**** |        |        |

#### 三步法：

| 反应阶段 | 循环数                | 温度      | 时间   |
|------|--------------------|---------|------|
| 预变性  | 1                  | 95°C    | 30s* |
| 变性   | 30                 | 95°C    | 20s  |
| 退火   |                    | 50-60°C | 20s  |
| 延伸   |                    | 72°C**  | 30s  |
| 溶解曲线 | 使用仪器默认溶解曲线采集程序**** |         |      |

\*该预变性条件适合绝大多数扩增反应，如模板结构复杂，可将预变性时间延长至 3-5 min 以提高预变性效果。

\*\*建议采用快速 qPCR 反应程序，退火温度请以 58-62°C 作为设定范围的参考，发生非特异性反应时，可提高退火温度。若因使用 Tm 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行常规 qPCR 扩增，退火温度请以 56-64°C 的范围作为设定参考。

\*\*\*对于 200 bp 以内的扩增子，延伸时间可设为 10 s；超过 200 bp 时，推荐延伸时间≥15 s。

\*\*\*\*融解曲线分析请以所使用的荧光定量 PCR 仪推荐的程序进行设定，由于仪器采集程序区别较大，在此不做推荐。

## 08/ Q&A

### Q：无 Ct 值出现

#### A：

- 1) 检测荧光信号的步骤有误：一般染料法采用 72°C 延伸时采集，探针法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。
- 2) ROX 使用错误或者加量有偏差：当 ROX 浓度太低或太高时，都会影响机器修正后显示的荧光值，Ct 值会显示为 unknown 或空白，可以根据仪器的类型选择合适的 ROX 类型（I 或 II），并严格按照 1：50 的比例添加。
- 3) 引物或探针降解：可通过电泳检测其完整性。
- 4) 模板量不足：对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。
- 5) 模板降解：避免杂质的引入及反复冻融，必要时可以重新制备模板。

**Q: Ct 值出现过早(Ct<38)**

A:

- 1) 扩增效率低, 反应条件不够优化: 设计更好的引物或探针; 适当降低退火温度; 改为三步法扩增。
- 2) PCR 各种反应成分降解或上样量不足: 更换试剂或加大上样量, 重复实验。
- 3) PCR 产物太长: 一般采用 80bp~150bp 的产物长度。
- 4) 热启动时间过短, 酶活性中心没有完全暴露, 活性发挥受到了影响: 建议热启动时间不低于 1 分钟。

**Q: 标准曲线线性关系不佳**

A:

- 1) 加样存在误差, 导致标准品不呈梯度: 重新加样并重复实验。
- 2) 标准品出现降解: 应避免标准品反复冻融, 或重新制备并稀释标准品。
- 3) 引物或探针不佳: 重新设计更好的引物和探针。
- 4) 模板中存在抑制物, 或模板浓度过高: 更换模板或提高模板稀释倍数。

**Q: 扩增曲线异常, 如断裂或者锯齿状曲线?**

A:

- 1) ROX 使用错误或者加量有偏差: ROX 浓度太低或太高时, 机器对荧光值进行修正后会产生断裂的曲线, 可根据说明书进行调整。
- 2) 分析数据时通道选择不正确, 如没有在 PCR mix 中加入 ROX, 但分析时在仪器设置中选择了 ROX 选项, 应根据反应的具体操作情况选择合适的通道。
- 3) 模板的浓度太高/降解或荧光染料发生了降解: 建议更换模板或 mix。
- 4) 反应管内有气泡: 混匀后离心, 避免气泡的残留。
- 5) 程序设置时间不当: 适当延长延伸时间 (40~60 秒), 充分收集荧光信号。

**Q: 负对照有信号**

A:

- 1) 引物设计不够优化: 应避免引物二聚体和发夹结构的出现。
- 2) 引物浓度不佳: 适当降低引物的浓度, 并注意上下游引物的浓度配比。
- 3) 模板有基因组的污染: RNA 提取过程中避免基因组 DNA 的引入, 可以稀释模板的浓度或者更换模板。
- 4) 反应体系污染: 更换 mix、水或者引物等, 避免交叉污染。

**Q: 溶解曲线不止一个主峰**

A:

- 1) 引物浓度过高或者设计不够优化: 应降低引物浓度或者重新设计引物, 避免产生引物二聚体。
- 2) 体系被污染: 更换试剂后重复实验。
- 3) 反应条件不够优化, 引起非特异性扩增: 设计特异性更高的引物或探针; 适当提高退火温度。

**Q: 同一试剂在不同仪器上产生不同的曲线, 如何判断?**

A: 判断标准: 扩增效率, 灵敏度, 特异性。如果扩增效率在 90%~110%, 都是特异性扩增, 可以把数据用于分析。

**Q: 溶解曲线中, Tm 不出现在 80 度左右是怎么回事?**

A: 扩增片段 100bp 左右的, 一般应该出现在 80 度左右。如果低于此温度出现, 可能是模板降解。

**Q: 溶解程序可否不加?**

A: 如果扩增效果好, 特异性高, 可以选择不加溶解程序 (建议加上)。此外, 不同的机型对应不同的溶解曲线设置程序, 可根据机型进行相应的设置。

**Q: 扩增反应体系 5 μl, 扩增效率低, 是什么原因?**

A: 反应体系太小, 各种因素的影响相对较大, 比如引物浓度、模板浓度及金属离子等都会影响扩增效率。